

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-173459

⑬ Int.Cl.⁴

G 01 N 27/46
27/30

識別記号

庁内整理番号

A-7363-2G
E-7363-2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月6日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭59-30544

⑰ 出 願 昭59(1984)2月20日

⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	南 海 史 朗	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	飯 島 孝 志	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑳ 出 願 人	松下電器産業株式会社	門真市大字門真1006番地	
㉑ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

- (1) 絶縁性の基板上に測定極と対極および参照極からなる電極系を設け、この電極系を酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有する多孔体に被覆したバイオセンサ。
- (2) 測定極と対極および参照極が白金である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (3) 多孔体が親水性の多孔体膜である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (4) 酸化還元酵素及び色素が上記多孔体膜に乾燥状態で保持されている特許請求の範囲第3項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の生体試料中の特定成分を迅速かつ容易に定量することのできるバイオセンサに関するものである。

従来例の構成とその問題点

近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のバイオセンサが開発され、特に臨床検査分野への応用が試みられている。検査項目及び検体数が増加している現在、迅速に精度よく測定できるバイオセンサが望まれている。

グルコースセンサに例をとると、糖尿病の増加が激しい今日、血液中の血糖値を測定し管理するには、以前のように血液を遠心分離し血漿にして測定するのでは非常に時間がかかるため、全血で測定できるセンサが要求されている。簡易型としては、尿検査の時に使用されている検査紙と同様に、スティック状の支持体に糖(グルコース)にのみ反応する酵素および酵素反応時又は酵素反応の生成物により変化する色素を含有する担体を設置したものがある。この担体に血液を添加し、一定時間後の色素の変化を目又は光により測定する方式であるが、血液中の色素による妨害が大きく精度は低い。

そこで、第1図のような多層式の分析担体が開

発されている。透明な支持体1の上に試薬層2、展開層3、防水層4、透過層5が順に積層した構造となっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず透過層5により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層4にある小孔4aから展開層3へ均一に浸透し、試薬層2において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体を通して矢印の方向から光をあて、分光分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体にくらべ、複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層4が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要があり、装置および担体が複雑化するという問題がある。

最近、酵素反応と電極反応を結びつけて基質濃度を測定するバイオセンサが開発されている。グルコースセンサに例をとると、第2図のように、グルコースオキシダーゼ固定化電極6を容器7に

入れ、緩衝液8で満たし、スターラ9で攪拌している中に試料液を添加する。グルコースオキシダーゼ固定化電極6には定電圧が印加されており、試料中のグルコースと反応して生成した過酸化水素を検知して電流が流れ、グルコース濃度が測定できる。この方式を用いれば、血液中の色素などに妨害されず迅速に測定できる。しかし、攪拌装置が不可欠なため泡が発生したり、液の乱れが精度に影響するという問題があった。又希釈しているため、緩衝液の量や試料の添加量に精度が要求され、操作が複雑化する不都合があった。

発明の目的

本発明は、上記の問題点を克服し、生体試料中の特定成分を小型で簡易に、しかも安定に精度よく測定できるバイオセンサを得ることを目的とする。

発明の構成

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に測定極と対極および参照極からなる電極系を有し、前記電極系を酸化還元酵素および酸化還元酵素と

共役する酸化型色素を含有する多孔体で被覆したことを特徴とする。

本発明のバイオセンサは、簡易に製造でき、かつこのバイオセンサを用いることにより、生体試料を適量添加するだけで、試料液の特定成分を高感度に精度よく測定することができる。

実施例の説明

バイオセンサの1つとして、グルコースセンサを例に説明する。酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼを、酸化還元酵素と共役する酸化型色素としてフェリシアン化カリウムを用い、電極系を構成する材料として安定な白金を用いた。第3図にグルコースセンサの一実施例の模式図を示す。塩化ビニル樹脂からなる絶縁性の基板10に白金を糊めこみ測定極11と対極12および参照極13とした。前記電極系を覆うようにナイロン不織布14を設置した。このナイロン不織布14は、あらかじめグルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムを溶解した液を含浸し、乾燥して作製したものである。

このナイロン不織布14上にグルコース標準液を添加し、充分浸透させた後、参照極13を基準に測定極11の電圧を0〜+0.5Vの間で鋸歯状に0.1V/秒で変化させた。添加されたグルコースがナイロン不織布14に担持されているグルコースオキシダーゼ15により酸化される際、酵素-色素共役反応によりフェリシアン化カリウム16が還元され、この反応によって生成されるフェロシアン化カリウムを測定極11の電圧を掃引することにより酸化し、その時酸化電流が流れる。この酸化電流は色素の変化量に比例し、色素が十分に存在すれば色素の変化量は基質濃度に対応するため、電流値を測定すると基質であるグルコースの濃度が検知できる。得られた電流値と添加したグルコース濃度は、 $600 \mu\text{g}/\text{dl}$ まで非常によい直線性を示した。又ナイロン不織布14は測定のために交換したが、再現性も良好であった。又、グルコース標準液の添加量を20〜140 μl の範囲で変化させたが、添加量に関係なく一定の値を示した。

測定極及び対極からなる2電極系においても測定が可能であるが、対極が少なくとも測定極の2倍以上の面積にしないと安定した電流値が得られなかった。これは、基準となる対極の電位が電流を流すことにより動いてしまうからである。又、銀塩化銀を対極に用いると電位は安定するが、製造する手間および組み込みの点で不便であった。

参照極を設置して3電極系にすることによって電位が安定し、測定極、対極、参照極が同面積でも精度よく測定することが可能となった。これにより、小型化が可能となった。

第4図は塩化ビニル樹脂よりなる絶縁性基板17の上に白金をスパッタ法あるいは蒸着法により測定極18と対極19および参照極20を薄膜状に形成した例を示す。スパッタすることにより電極面積を自由に調節でき、特に同一の電極を大量に製造する時、効果が大きかった。この上に点線て示すように酵素と酸化型色素を保持したナイロン不織布をのせ試料を添加すると、第3図の電極と同様に良い応答が得られたため、電極毎交換

することも可能となった。

酸化型色素としては、上記に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので通しているが、P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノール、インドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 β -ナフトキノジ4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

酸化型色素および酵素を含む多孔体は、試料液をすみやかに吸収して酵素反応をおこなわせることができるように、親水性の多孔体膜であることが望ましい。たとえば、ろ紙やバルブの不織布、ガラスの多孔体、セラミック多孔体などを用いると、試料液が均一にすばやく浸透し再現性も良好であった。さらにナイロン不織布において、界面活性剤で処理したものは、処理しなかったものよりすみやかに液が浸透し、再現性が向上した。

酸化型色素と酵素を細かく粉碎後加圧して成形体として電極上に設置することもできる。この加圧成形体に血液を添加すると、すみやかに浸透し

迅速に反応した。なお、酸化型色素と酵素を加圧成形する際、 SiO_2 のような結着剤を少量混合すると、成形体の強度が増すので取り扱いが簡易となる。結着剤としては、酵素反応及び電極反応に無関係で親水性のものが通している。

酸化型色素および酵素は、なるべく血液の液体成分に早く溶ける状態にしておくことが望ましい。そこで、色素の溶液をナイロン不織布に浸漬後、ドライヤーにより熱風乾燥すると、真空乾燥したものより非常に細かい結晶となり、液体にとけやすくなった。又、色素の溶液を浸漬したナイロン不織布を、エタノールのような水にとける有機溶媒中に浸漬後、真空乾燥すると、さらに細かい結晶を担持することができた。酵素は熱などにより活性が失活するので、浸漬後真空乾燥を行なった。

第5図は、第3図と同じ電極系の上に、グルコースオキシダーゼ15を含浸後真空乾燥により担持したナイロン不織布21を、さらにその上部にフェリシアン化カリウム16を含浸後エタノールに浸漬し乾燥して担持したナイロン不織布22を

設置した例を示す。血液を添加すると、フェリシアン化カリウムがすみやかに溶け、グルコースオキシダーゼの層に浸透するため、反応時間が約1分間と短く、再現性も良好であった。グルコースオキシダーゼの層とフェリシアン化カリウムの層を逆に設置しても同様に迅速に反応した。

本発明のセンサは、グルコースに限らず、アルコールセンサや、鮮度に関係するイノシンセンサなど酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酵素は固定して担持してもよく、固定化することにより、酵素の活性を長期間安定に保持することができる。

発明の効果

測定極と対極および参照極からなる電極系に酸化還元酵素と酸化還元酵素と共役する色素を含んだ親水性の多孔体を設置し、直接試料液を添加して測定することにより、微量の試料液を感度よく測定できるようになった。

4. 図面の簡単な説明

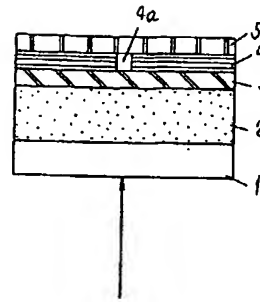
第1図及び第2図は従来のグルコースセンサの

構成を示す略図、第3図は本発明の一実施例のグルコースセンサの断面模式図、第4図は他の例の表部の平面図、第5図はさらに他の例の断面模式図である。

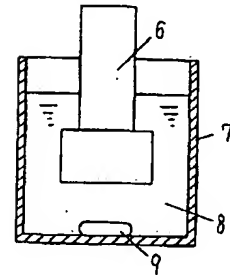
10……基板、11……測定極、12……対極、
13……参照極、14……多孔体、15……酵素、
16……色素。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

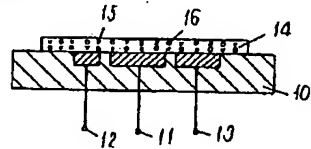
第 1 図



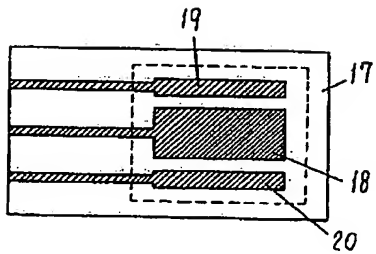
第 2 図



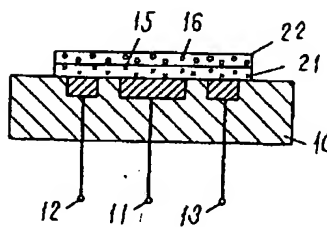
第 3 図



第 4 図



第 5 図



平成 3. 4. 25 発行
手 続 補 正 書

平成 2 年 11 月 5 日

特 許 庁 長 官 殿

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

平 3. 4. 25 発行

昭和 59 年特許願第 30544 号(特開昭
60-173459 号, 昭和 60 年 9 月 6 日
発行 公開特許公報 60-1735 号掲載)につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
たので下記のとおり掲載する。 6 (1)

Int. Cl. ' 識別記号	庁内整理番号
GOIN 27/327	B-7235-2G GOIN 27/30 -353 J-7235-2G GOIN 27/30 -353 R-7235-2G GOIN 27/30 -353

1 事件の表示

昭和 59 年 特 許 願 第 30544 号

2 発明の名称

バイオセンサ

3 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人
住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
名 称 (582) 松下電器産業株式会社
代 表 者 谷 井 昭 雄

4 代 理 人 〒 571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内

氏 名 (7242) 弁理士 小 鍛 治 明
(ほか 2 名)
[連絡先 電話(03)434-9471 知的財産センター]

5 補 正 の 対 象

明細書の特許請求の範囲の欄
明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書の特許請求の範囲を別紙の通り補正します。
- (2) 明細書第4頁第18行~第19行の「絶縁性の基板上に……電極系を有し、」を「絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を有し、」に補正します。
- (3) 同第7頁第1行~第4行の「測定電極及び対極……電流値が得られなかった。」を「測定極および対極からなる2電極系においても測定が可能であり、対極を少なくとも測定極の2倍以上の面積にすると安定した電流値が得られた。」に補正します。
- (4) 同第7頁第19行~第20行の「第3図の電極……電極毎交換」を「第3図の電極と同様に良い応答が得られ、同一面積の他の電極を用いてもそろった応答が得られたため、電極毎交換」に補正します。
- (5) 同第10頁第14行の「測定極と対極および参照極からなる電極系」を「少なくとも測定

極と対極からなる電極系」に補正します。

2. 特許請求の範囲

- (1) 絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、この電極系を酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有する多孔体で被覆した~~生~~^死バイオセンサ。
- (2) 測定極と対極が白金である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (3) 多孔体が親水性の多孔体膜である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (4) 酸化還元酵素および酸化型色素が多孔体膜に乾燥状態で保持されている特許請求の範囲第3項記載のバイオセンサ。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.